

**UNTERSUCHUNG DER HÄMOGLOBIN-KOMPONENTE X
VON CHIRONOMUS THUMMI THUMMI**

Siegfried Silz

1972

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

UNTERSUCHUNG DER HÄMOGLOBIN-KOMPONENTE X

VON CHIRONOMUS THUMMI THUMMI

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
~~Naturwissenschaftlichen~~ Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekanat
der Fakultät für
Chemie und Pharmazie
der Universität München


vorgelegt von
Siegfried Silz
aus
München

Erster Referent: Prof. Dr. G. Braunitzer

Zweiter Referent: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 19. April 1972



Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung</u>	1
Aufarbeitung der Zuckmückenlarven und Isolierung der Hämoglobine	4
Gewinnung von CTT-XI	5
Bildung von gemischten Dimeren	6
Bildung verschiedener Aggregate bei Thummi-Hb's	
Charakterisierung der Komponenten X und XI	7
Bruttoformeln	8
Tryptophanbestimmungen	10
Über die tryptischen Peptide von CTT-X	11
Spaltung mit Trypsin	
Bestimmung der freien AS aus dem trypt. Hydrolysat	12
Trennung und Reinigung der Peptide	
System der Peptidbezeichnung	15
Säulenchromatographie über Dowex 1 x 2	
Rechromatographie der registrierten Gipfel	17
Isoelektrische Fällung des Cores	18
Chromatographie der basischen und neutralen Peptide aus dem Säulenlauf über Dowex 1 x 2	
Reinigung des Corepeptides	20
Aminosäureanalysen	21
Tabelle der zugeordneten tryptischen Peptide	22
Nicht zugeordnete tryptische Peptide	23
Zuordnung der Peptide	24
Sequenzermittlung	
Bruttoformel von CTT-X	25
Zur Zeichensprache	
Bruttoformel	27
Begründung der Bruttoformel	28

<u>Diskussion</u>	33
<u>Experimenteller Teil</u>	41
<u>Zusammenfassung</u>	53
<u>Literatur</u>	54

ABKÜRZUNGEN

AS	Aminosäure
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
CTT	Chironomus thummi thummi
CTT-I, CTT-III	Komponente I, III, IV und X
CTT-IV, CTT-X	der Hämoglobine von CTT
DANS-	1,5-Dimethylamino-naphtalin-sulfonyl-
T	Tryptisches Peptid
P	Peptisches Peptid
E	Extinktion
V _e	eluiertes Volumen
Rf	Referenzgemisch

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer im Max-Planck-Institut für Biochemie in München in der Zeit vom Januar 1970 bis April 1971 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt danke ich herzlich für die Hilfe zur Erlangung eines Hochschulstudiums und für die großzügige Förderung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer möchte ich für Anregungen und Ratschläge danken.

Herrn A. Stangl danke ich für die wertvolle Unterstützung bei der Trennung der Peptide. Bei den Fräulein H. Kummer und J. Pickel bedanke ich mich für die gewissenhafte Durchführung der Aminosäureanalysen.

Einleitung

Für die molekulare Biologie ist das Hämoglobin auf Grund seines Vorkommens fast im gesamten Tierreich und wegen seiner leichten Zugänglichkeit von besonderem Interesse. Es zählt zu den am intensivsten erforschten biologischen Makromolekülen.^{1, 2}

Es ist bekannt, daß bei Proteinen die Sequenz der Aminosäuren auch die Tertiärstruktur festlegt.³ Weiterhin haben die reversible Denaturierung von Ribonuklease und Röntgenkristallographie an Hämoglobinen⁴ gezeigt, daß nur eine definitive Tertiärstruktur für jedes Protein existiert, die durch Änderung der Aminosäureabfolge fast nicht beeinflußt wird, selbst wenn diese so groß ist, wie die Unterschiede in Hämoglobinen verschiedener Tierklassen.⁵ Darüberhinaus spielen bei der Bildung des endgültigen Proteinproduktes gewebsspezifische Mechanismen zweifellos auch eine wichtige Rolle. Auf diese Weise ist es erklärbar, daß manche Enzyme, wie z.B. die Lactatdehydrogenase, in verschiedenen Organen in differenten molekularen Formen existieren. Sie katalysieren die gleichen Reaktionen, weisen jedoch verschiedene physikalische und chemische Eigenschaften auf. Sie werden als Isoenzyme, oder kurz Isozyme bezeichnet.^{6, 7} Die Bedeutung der verschiedenen hybriden Molekülformen wird darin gesehen, daß bedingt durch geringfügige Änderung ihrer katalytischen Eigenschaften eine optimale Adaption an das jeweilige Gewebe, bzw. Organ erreicht wird.

Auch die Unterschiede zwischen Enzymen fötaler und adulter Organismen lassen sich mit Hilfe derartiger Isozym-Systeme unterschiedlicher katalytischer Eigenschaften erklären. In Einzellern, wie den Bakterien, findet man keine Isozyme. In vielzelligen Organismen bei denen die Differenzierung der Zellgewebe zu einzelnen Organen begonnen hat, sollten Hybridmoleküle ohne definitive Lokalisation zu finden sein.

Bei der Betrachtung der Entwicklungsprobleme scheinen einige Eigenschaften des Hämoglobins der Zuckmückenlarve *Chironomus thummi thummi* besonders evident zu sein. Es tritt, wie bei den anderen Invertebraten, frei in der Hämolymphe gelöst auf. Allerdings wird seine Quartärstruktur, nicht wie bei den meisten anderen Wirbellosen durch eine große Anzahl von Polypeptidketten gebildet. Dagegen überraschen die *Chironomus*-Hämoglobine durch eine Vielzahl verschiedener Komponenten⁸, die in einem Individuum existieren. Hierbei kann es sich eventuell um einen Zwischenzustand in der Evolution handeln, bei dem eine beachtliche Anzahl von Isozymen vorliegt, ohne daß diese einzelnen Geweben oder Organen zugeordnet werden können. Es wurde gezeigt, daß ein Teil der *Chironomus*-Hämoglobine in Lösung stets monomer, ein anderer Teil stets dimer vorliegt.⁹ Andere wiederum bilden ein Gleichgewicht zwischen monomerer und dimerer Form aus. Einige der dimeren Hämoglobine können zum Teil tetramere Formen bilden. Interessant scheint diese Tatsache als Vorwegnahme eines phylogenetischen Prinzips zu sein, wie es auch bei *Glycera dibranchiata* und einigen Vertebraten vertreten ist.^{10, 11}

Darüber hinaus können sich verschiedene Ketten zusammenlagern und Dimere des Typs α/β bilden.

Die Aufklärung der Tertiärstruktur einer willkürlich herausgegriffenen Komponente des *Chironomus*-Hämoglobins mittels Röntgenanalyse⁴ ergab eine außerordentlich nahe Verwandtschaft mit der Tertiärstruktur des Myoglobins des Pottwals. Die Vermutung, daß die übrigen Hämoglobine von *Chironomus thummi thummi* ähnliche Tertiärstrukturen aufweisen, liegt nahe. Sollte die weitgehende Gleichheit der Tertiärstrukturen ein Zeichen für eine physiologische Funktion sein, so stellt sich die Frage, welche Abweichungen in der Sequenz der Aminosäuren toleriert werden können, wenn die Tertiärstruktur erhalten bleiben soll.

Nachdem von den Komponenten CII-I¹² und CTT-III²⁷ die Aminosäuresequenzen bestimmt worden waren, konnte im Laufe dieser Arbeit die Bruttoformel der Komponente X des Hämoglobins von *Chironomus thummi thummi* aufgestellt werden. Das Globin wurde mit Trypsin gespalten, das Peptidgemisch chromatographisch aufgetrennt. Durch Zuordnung der isolierten und teilweise sequenzierten Peptide zu den Ketten von CTT-I und CTT-III konnte ein Vorschlag zur Bruttoformel vorgelegt werden. Beim Vergleich von CTT-X mit anderen Chironomushämoglobinen zeigte sich, daß bei den Hämoglobinen aus einem Tier, auf Grund von Ähnlichkeiten in der Primärstruktur, eine Reihe der Verwandtschaft der Sequenzen aufgestellt werden kann, ohne daß zunächst über die Reihenfolge der Biosynthese Angaben gemacht werden können. Außerdem ergab sich, daß die Bildung der Hämkomplexe innerhalb verschiedener Chironomushämoglobine auf unterschiedliche Weise erfolgen muß, da bei den einzelnen Hämoglobinen von Thummi die Positionen in den Sequenzen, die maßgeblich an der Bindung des Häms beteiligt sind, von unterschiedlichen Aminosäuren eingenommen werden. Bei CTT-X wurde erstmals in einem Chironomus-Hämoglobin das distale Histidin (E 7) gefunden. Die Kettenlänge von CTT-X entspricht den Kettenlängen der früher untersuchten Chironomushämoglobine.

Aufarbeitung der Zuckmückenlarven und Isolierung der Hämoglobine

Die Aufarbeitung der Zuckmückenlarven wurde, mit geringen Abwandlungen, nach Braun⁸ durchgeführt. Nach Homogenisieren, Zentrifugieren und Ammoniumsulfatfällung wurde dialysiert und anschließend eine Vortrennung nach Molekulargewichten über Sephadex G 75 durchgeführt. Hierbei wurden zwei Hämoglobin-Banden eluiert. Die rascher laufende Bande enthält das Gemisch der dimerisierenden Hämoglobine, die langsamere die monomer vorliegenden. Die Eluate werden zur besseren Aufbewahrung lyophilisiert und daraus durch Chromatographie an DEAE-Cellulose-Austauschern die einzelnen Hämoglobine gewonnen. Durch kombinierte Anwendung von pH- und Salzgradienten gelang die schrittweise Elution der einzelnen Komponenten. Durch Discelektrophorese wurden die einzelnen Hämoglobine nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit charakterisiert und zugeordnet.

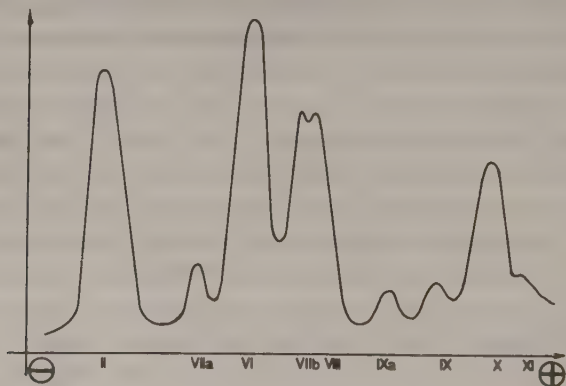


Abb. 1: Elektropherogramm der dimeren Hämoglobine von CTT. Nach Anfärbung eines Polyacrylamidgels mit Amidoschwarz wurde dieses densitometrisch vermessen.

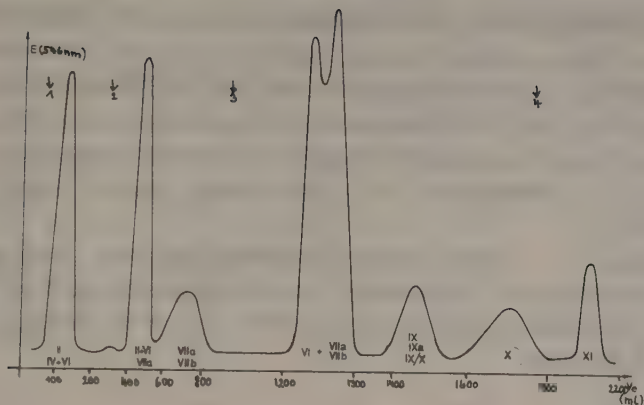


Abb. 2: Trennung der dimeren thummi-thummi Hämoglobine über DEAE-Cellulose. An den (↓) markierten Stellen wurden Gradienten angelegt (Vers. Bed. S. 42).

Gewinnung von CTT XI

Bei der Durchführung der Trennung der dimeren Hämoglobine an DEAE-Cellulose-Austauschern wurde erstmals die Komponente XI gewonnen (S. 42). Sie wurde anschließend charakterisiert. Der Hämoglobin-Rohextrakt enthält ca.

5 - 8 % Komponente X

3 - 6 % Komponente XI

Bildung von gemischten Dimeren

Die dimeren Komponenten IX und X werden bei der Chromatographie an DEAE-Cellulose häufig zusammen eluiert. Die entsprechenden Fraktionen enthalten meist ca. 20 % CTT-IX und 80 % CTT-X. Bei der Rechromatographie dieses Gemisches über Sephadex G 75 werden 2 Gipfel eluiert. Die erste enthält CTT-IX und X im Verhältnis 1 : 1. Der zweite Gipfel enthält reines CTT-X.

Das Gemisch (1 : 1) wurde durch Discelektrophorese, Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren und Ultrazentrifugation untersucht. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß hier Dimere des Typs α/β vorliegen.

Bildung verschiedener Aggregate bei CTT Hämoglobinen

Bei der Vortrennung von monomeren und dimeren Hämoglobinen aus CTT an Sephadex G 75 wurde bereits vor der breiten Bande, in welcher die Dimeren eluiert werden, eine schwach rote Bande gefunden. Diese enthielt hauptsächlich die Komponenten II, IX und X. Aus dem Elutionsprofil wurde geschlossen, daß diese Hämoglobine hier tetramer vorliegen. Deshalb wurden Gemische aus Monomeren, aus Dimeren und die Komponenten II, VI und X einer Untersuchung durch Röntgenkleinwinkelstreuung⁹ unterzogen. Die Kleinwinkelstreuung mit Röntgen- oder Neutronenstrahlen ist eine gute Methode, um die Dimensionen von gelösten Makromolekülen zu ermitteln. Sind in der Lösung zwei unterschiedlich große Molekültypen vorhanden, so ist es möglich, die individuellen Streumassenradien zu ermitteln. Die Streuungsexperimente wurden mit einer^{9 b} Kratky-Kamera durchgeführt. Da die Ergebnisse derartiger Messungen stark ligandenabhängig sind, wurden sämtliche Arbeitsgänge bei der Präparation der Hämoglobine mit Kohlenstoffmonoxid gesättigten Puffern durchgeführt. Die Hämoglobinlösungen wurden vor

der Messung erneut mit CO gesättigt. Zur Sättigung wurde Kohlenstoffmonoxid bei 0°C mit geringem Überdruck gebracht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefaßt:

Fraktion	Konzentration (%)	pH	gefundener Radius (Å)	Zusammensetzung
monomere	0,96	8,5	12,8	100 % monomer
dimere	0,83	8,5	21,6	79 % tetramer 21 % dimer
CTT-II	0,98	8,5	21,75	78 % tetramer 22 % dimer
CTT-VI	1,10	8,5	17,70	73 % dimer 27 % monomer
CTT-X	1,90	6,8	21,6	80 % tetramer 20 % dimer

Tabelle 1: Durch Röntgenkleinwinkelstreuung ermittelte Molekülradien und Aggregate der thummi Hämoglobine.
Ligand: Kohlenstoffmonoxid.

Charakterisierung der Komponenten X und XI

Bestimmung der Endgruppen

N-Terminus

Für die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren wurde jeweils der erste Schritt eines Edman-Abbaus am Papier nach Shelton und Schröder ²⁴ am Protein durchgeführt. Außerdem wurde die Endgruppenbestimmung nach Hartley und Gray ²⁵ durchgeführt. Hier wird die Aminogruppe der N-Terminalen Aminosäure mit Dansylchlorid umgesetzt und nach saurer Hydrolyse des Proteins auf Polyamid-Dünnschicht-Platten chromatographiert. Es wurden gefunden:

CTT X	Asparaginsäure
CTT XI	Glycin

C-Terminus

Die C-terminale Aminosäure wurde sowohl durch Hydrazinolyse ¹⁴, als auch durch Spaltung mit Hilfe von Carboxypeptidase bestimmt. Hierbei konnten folgende Aminosäuren identifiziert werden:

CTT X	Serin
CTT XI	Serin

Bruttoformeln

Von den gereinigten Komponenten XI und X wurden nach Hydrolyse Analysen durchgeführt und folgende Ergebnisse erhalten:

CTT-XI	20h		20h	
Lys	10,05	Gly	8,44	Nach Oxydation mit Per- ameisensäure und an- schließender saurer Hy- drolyse konnte bei CTT-XI ein Cystein-Rest nachge- wiesen werden.
His	5,72	Ala	14,87	
Arg	3,97	Val	8,14	
Asp	16,63	Met	1,40	
Thr	7,89	Ile	7,79	
Ser	10,50	Leu	10,45	
Glu	13,97	Tyr	2,96	
Pro	4,42	Phe	9,14	

CTT-X	20h	20h	48h	48h	72h	72h
Lys	9,36	9,91	9,71	9,69	9,99	9,83
His	7,00	7,72	7,34	7,54	7,49	7,49
Arg	3,74	3,79	3,59	3,47	3,13	3,43
Asp	14,91	14,30	14,29	14,50	14,30	14,30
Thr	8,46	9,30	9,87	9,78	9,82	9,56
Ser	9,50	8,30	9,95	9,51	9,39	9,58
Glu	13,80	13,10	12,79	13,20	13,50	13,06
Pro	3,74	3,90	3,34	3,37	3,58	3,80
Gly	8,87	8,40	8,64	8,44	8,79	8,64
Ala	14,84	15,21	15,00	15,02	15,30	14,67
Val	8,46	8,57	9,09	8,85	9,11	9,18
Met	1,94	1,97	1,78	1,92	1,13	1,49
Ile	7,76	7,48	7,72	7,85	8,27	8,16
Leu	9,64	9,56	9,33	9,29	9,44	9,42
Tyr	2,77	2,60	2,35	2,26	1,33	1,71
Phe	10,12	10,60	10,04	10,00	10,20	10,00

Tabelle 2 und 2 a: Aminosäureanalysen von CTT-XI und -X je-
weils auf 135 Aminosäuren berechnet.

Tryptophanbestimmungen

Es wurden folgende Bestimmungsmethoden angewandt:

1) Nach Beaven und Holyday ¹⁵

Es wurde 1 mg Globin in 0,1 n Natronlauge gelöst und die Extinktion bei 280 und 294 nm gemessen. Für CTT-X wurde folgendes Ergebnis gefunden:

$E_{280} = 1,012$ Geht man bei der Berechnung von den 3 gefundenen Tyrosinen aus, so ergibt sich ein Tryptophanwert von 1,60.
 $E_{294} = 0,800$

2) Nach Matsubara ¹⁶

Führt man die saure Hydrolyse in Gegenwart von 6 % Thioglykolsäure durch, so kann Tryptophan mit Hilfe des Aminosäureanalysators nachgewiesen werden. Die Ausbeute beträgt auch hier nicht 100 %, sondern liegt durchschnittlich zwischen 45 und 80 % der theoretischen Werte. Für CTT-X wurde hier ein Wert von 1,80 gefunden.

Über die tryptischen Peptide von CTT-X

Spaltung mit Trypsin

Von allen bekannten Endopeptidasen hat Trypsin die größte Spezifität. Es spaltet eine Peptidkette fast ausschließlich am Carboxylende von Lysin und Arginin, so daß bei bekannter Anzahl dieser Aminosäuren die theoretische Zahl der Spaltstücke vorhergesagt werden kann. Bei bestimmten Aminosäurefolgen kann es jedoch zu störenden Nebenspaltungen mit erheblichen Ausbeuten kommen. Vor Asparaginsäure spaltet Trypsin schlecht und vor Prolin tritt praktisch keine Spaltung ein. Gelegentlich wird eine Spaltung hinter Tyrosin beobachtet. Bei der an CTT-X durchgeführten tryptischen Hydrolyse wurde mehrmals eine Spaltung hinter aromatischen Aminosäuren gefunden. Dies dürfte vermutlich auf chymotryptische Nebenaktivitäten des verwendeten Enzyms zurückzuführen sein.

Die tryptische Spaltung wurde mit geringen Abwandlungen nach Liebold und Braunitzer ¹⁷ durchgeführt. Der pH-Wert des Spaltgemisches wurde bei 9,0 konstant gehalten. Die Spaltung wurde nicht durch Ansäuern auf pH 6,4 beendet, sondern durch Einfrieren und anschließende Lyophilisation. Nach der Spaltung waren sämtliche Peptide gelöst.

Das zur Spaltung verwendete Material war hämfreies Globin. Die Qualität der Spaltung wurde anhand von Fingerprints geprüft ¹⁸. In der folgenden Abbildung ist ein tryptischer Fingerprint von CTT-X dargestellt.

Um festzustellen, ob Lys-Lys oder Lys-Arg Bindungen innerhalb der Sequenz vorliegen könnten, wurde sofort nach der Spaltung ein Teil des tryptischen Hydrolysates einer AS Analyse unterzogen. Die einzige frei vorliegende Aminosäure war Serin, was zu dem Schluß führte, daß die AS Folge am C-Terminus -Lys-Ser lauten könnte.

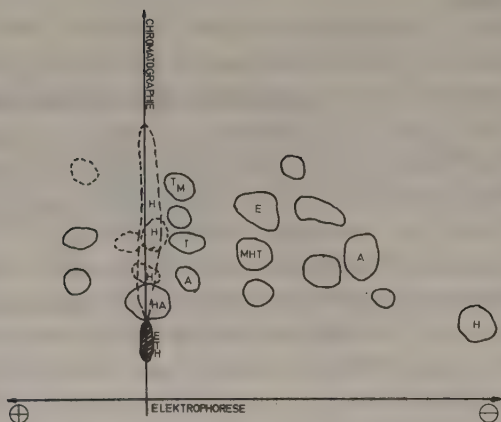


Abb. 3: Fingerprint von CTT-X

Alle ninhydrinpositiven Flecken sind eingezeichnet. Mit spezifischen Sprühreagentien ¹⁹ erhaltene Farbreaktionen wurden folgendermaßen gekennzeichnet:

A = Arginin, H = Histidin, M = Methionin, T = Tyrosin und E = Tryptophan.

Bestimmung der freien AS aus dem tryptischen Hydrolysat

Dem tryptischen Hydrolysat wurde ein Aliquot entnommen. Dieses wurde nach Gefriertrocknung am Aminosäureanalysator vermessen. In freier Form lag Serin vor.

Trennung und Reinigung der Peptide

Die Trennung des Peptidgemisches, wie es bei der enzymatischen Spaltung auftritt, kann sowohl auf Grund unterschiedlicher Peptidgrößen, als auch auf Grund von Ladungsunterschieden

den erfolgen. Allerdings gelingt die Trennung derart komplexer Gemische erfahrungsgemäß nicht in einem Arbeitsgang. Die im Verlauf der ersten Chromatographie erhaltenen Gipfel werden meistens aus mehreren Peptiden gebildet und müssen weiter aufgetrennt werden. Zur Rechromatographie finden normalerweise andere Säulenfüllungen Verwendung als beim ersten Schritt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Vortrennung zwei verschiedene Methoden angewandt, welche sich jeweils einen der beiden oben genannten Parameter zu Nutze machten.

- 1.) Die Vortrennung auf Grund der unterschiedlichen Molekülgröße der Peptide wurde versucht durch Chromatographie an Sephadex G 50 super fine. Als Elutionsmittel diente 0,1 prozentige Natriumbicarbonatlösung. Die erzielte Trennung über eine 2 m lange Chromatographiesäule war ungenügend und mußte über einen Ionenaustauscher wiederholt werden. Die Ausbeuteverluste an der verwendeten Sephadexsäule waren sehr gering, so daß das gesamte eingesetzte Material auch weiterhin zur Verfügung stand.
- 2.) Die Vortrennung auf Grund der Ladungsunterschiede erfolgte durch Chromatographie an einem Ionenaustauscher. An Stelle von Dowex 1 x 2 wurde Phosphorcellulose verwendet. Für die Elution dienten die bei Dowex ⁵⁰ erprobten Puffer.

Die Gipfelfractionen aus obigem Säulenlauf wurden eingeengt und aliquote Anteile daraus auf Cellulose Dünnschichtplatten in einem modifizierten Baglionsystem untersucht. Abbildung Nr. 5 zeigt das Diagramm wie es bei Auftrennung an Phosphorcellulose erhalten wurde. Abbildung Nr. 6 gibt das zugehörige Übersichtschromatogramm wieder, wie es auf Dünnschichtcelluloseplatten erhalten wurde.

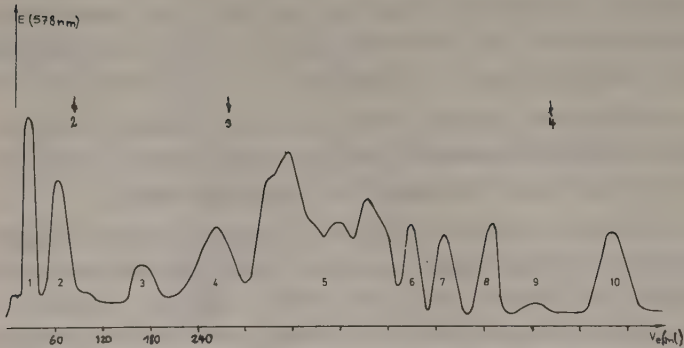


Abb. 4: Chromatographie der tryptischen Peptide über Phosphorcellulose. Aufzeichnung erfolgte kontinuierlich. Gemessen wurde die Ninhydrinfärbung bei 578 nm. An den (†) markierten Stellen wurden Gradienten angelegt (Vers. Bed. S. 46).

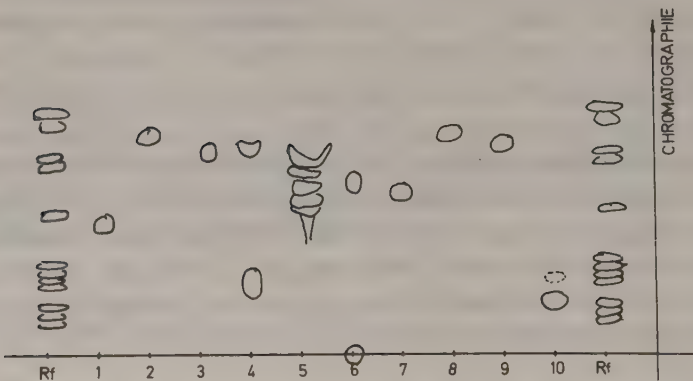


Abb. 5: Übersichtschromatogramm des Phosphorcelluloselaufes der ninhydrinpositiven Flecken.

Das Übersichtschromatogramm zeigt, daß unter einigen Gipfeln des Phosphorcelluloselaufes mehrere Peptide vereinigt sind. Um diese in reiner Form zu erhalten, müssen die Peptidgemische erneut chromatographiert werden. Für die Rechromatographie werden normalerweise Austauschermaterialien verwendet, die sich von den ersteren unterscheiden.

Für die Rechromatographie der einzelnen Gipfel wurden Anionenaustauscher verwendet. Zunächst wurden Dowex 1 x 2 Säulen verwendet. Konnte nach erfolgter Rechromatographie noch immer keine vollständige Trennung erzielt werden, so schloß sich eine Trennung über Papier oder Dünnschichtcelluloseplatten an. Die Chromatographien und Rechromatographien wurden größten Teils automatisch²⁰ durchgeführt. Verwendung fand der Präparativzusatz der Firma Beckman. Das Elutionsprofil der Chromatographie wird in einem Aliquot, der durch einen Verteiler abgenommen wird, kontinuierlich aufgezeichnet.

System der Peptidbezeichnung

Die große Zahl der durchgeführten Trennungen macht ein System in der Bezeichnung nötig, um Verwechslungen der isolierten Peptide auszuschließen.

Die Gipfel aus der jeweiligen Trennung wurden, entsprechend der Reihenfolge in welcher sie eluiert wurden, durchnummeriert. Den Nummern wurde eine Abkürzung des verwendeten Austauschermaterials vorgestellt. So wurde Phosphorcellulose durch PC, Dowex 1 x 2 durch D₁, Dowex 50 durch D₅₀, Animex durch A und Sphärisches Harz PA 28 durch Sph symbolisch ersetzt. Ein einem D₁ vorangestelltes V sagt aus, daß das entsprechende Peptid aus dem gesammelten und weiterverarbeiteten, nicht registrierten Vorlauf der Trennung stammt.

Auf diese Weise können sämtliche Chromatographien und die darauf folgenden Rechromatographien in logischer Folge nach-

einander angegeben werden.

Nachdem nicht alle Peptide nach obiger Technik gefunden oder gereinigt werden konnten, wurde folgender Weg eingeschlagen:

1. Säulenchromatographie über Dowex 1 x 2

In diesem Falle wurden nicht, wie zu späteren Chromatographien über Anionenaustauscher, die Puffer und Gradienten nach Rudloff und Braunitzer ²¹, bzw. Frank verwendet, sondern sofort Puffer hoher Ionenkonzentration angewandt, um sämtliche basischen und neutralen Peptide (auch das sog. "Core"), mit der nicht registrierten Front der Chromatographie im gesammelten Vorlauf zu erhalten. Saure und hydrophobe Peptide wurden vorgetrennt. Es wurde folgendes Elutionsprofil erhalten:

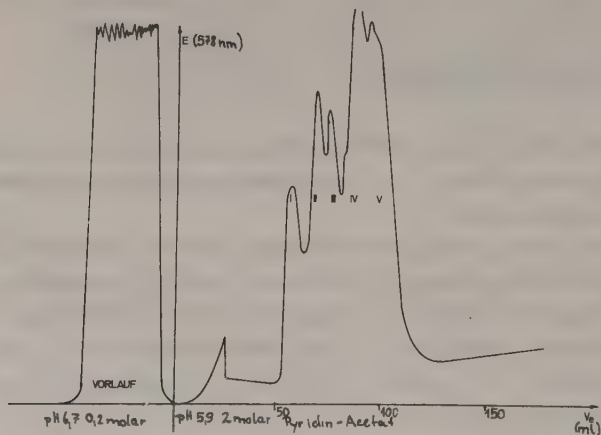


Abb. 6: Elutionsdiagramm der Vortrennung über Dowex 1 x 2. Der erste, vor der Ordinate liegende Gipfel wurde nicht registriert. Das entsprechende Eluat enthält alle basischen und neutralen Peptide.

Der Vorlauf wurde gesammelt und fast zur Trockne einrotiert. Die den Gipfeln (I, II, III) und (IV, V) entsprechenden Fraktionen wurden ebenso behandelt. Eingeklammerte Zahlen bedeuten hier, daß die diesen Zahlen entsprechenden Fraktionen gemeinsam weiterverarbeitet wurden.

2. Rechromatographie der registrierten Gipfel

(I, II, III) wurden (ebenso wie IV, V) über Animex Q 15 rechromatographiert. Es wurden folgende Elutionsdiagramme erhalten:

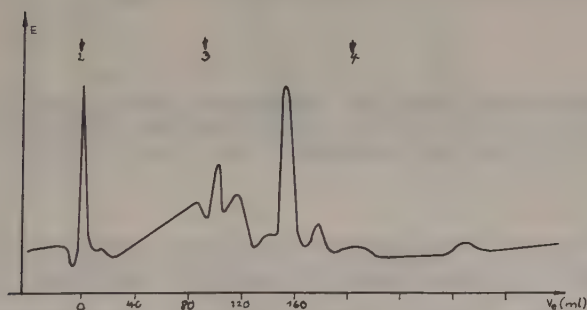


Abb. 7: Elutionsdiagramm der Rechromatographie von (I, II, III) über Animex Q 15. An den markierten Stellen (↓) wurden Gradienten angelegt (Vers. Bed. S. 47).

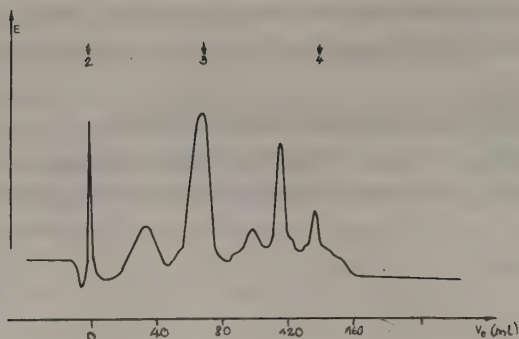


Abb. 8: Elutionsdiagramm der Rechromatographie von (IV, V) über Animex Q 15. An den markierten Stellen (†) wurden Gradienten angelegt (Vers. Bed. S. 47).

Die den Gipfeln entsprechenden Fraktionen wurden durch Chromatographie an Dünnschichtcelluloseplatten getestet. Es zeigte sich jedoch, daß die darin enthaltenen Peptide noch nachgereinigt werden müssen.

3. Isoelektrische Fällung des "Cores"

Durch vorsichtiges Ansäuern des Vorlaufes aus obiger Dowex 1 x 2 Chromatographie auf pH 6,3 fällt ein großes Peptid aus. Dieses wurde abzentrifugiert, mehrfach bei pH 6,3 gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Die Nachreinigung des auf diese Weise erhaltenen Peptides wurde über sphärisches Harz Typ PA 28 versucht.

4. Chromatographie der basischen und neutralen Peptide aus dem Säulenlauf über Dowex 1 x 2

Der aus obigem Säulenlauf über Dowex 1 x 2 erhaltene Vorlauf wurde über eine Dowex 50 x 1-Säule aufgetrennt. Es wurde folgendes Elutionsdiagramm erhalten. Die Fraktionen wurden, entsprechend den registrierten Gipfeln zusammengefaßt, fast zur Trockne einrotiert und anschließend einzeln über Animex-Austauscherharz rechromatographiert.

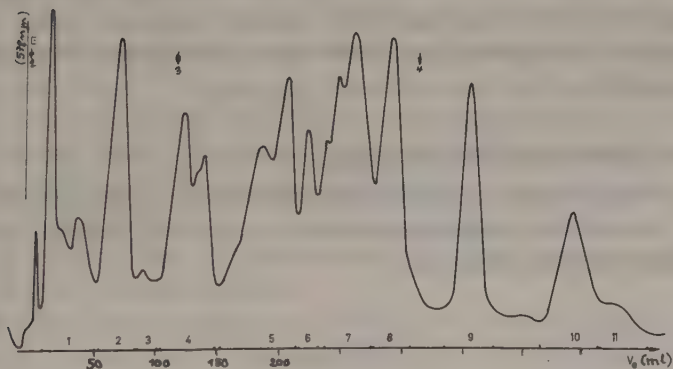


Abb. 9: Säulenchromatographische Auftrennung der tryptischen Peptide, die in der Vortrennung über Dowex 1 x 2 in Vorlauf gesammelt wurden, an Dowex 50. Die ausgezogene Linie gibt die Ninhydrinfärbung bei kontinuierlicher Elution wieder. An den markierten Stellen (X) wurden Gradienten angelegt. (Vers. Bed. S. 46)

Nach erfolgter Chromatographie wurden die den Gipfeln entsprechenden Fraktionen einrotiert und aliquote Teile davon entsprechend 0,1 n Mol auf Papier, im aufsteigenden System nach Baglioni chromatographiert. Nur Gipfel X entsprach einem reinen Peptid, welches keiner weiteren Reinigung unterzogen werden mußte. Alle anderen "Gipfelfraktionen" stellten Gemi-

sche aus mehreren Peptiden dar und mußten rechromatographiert werden.

5. Rechromatographie der Gipfelfractionen II, IV, V, VI, VII, VIII und IX

Um die Peptidgemische, wie sie aus dem Säulenlauf über Dowex 1 x 2 Harz gewonnen werden konnten, aufzutrennen, wurde an Animex Q 15-Austauscher rechromatographiert. Als Reinheitskontrolle wurde nach jedem Trennlauf von den entsprechenden Gipfelfractionen ein Übersichtschromatogramm auf Dünnschicht-Cellulose Platten durchgeführt. Reinen Peptiden wurden aliquote Teile entnommen und diese nach 20stündiger Hydrolyse analysiert.

6. Reinigung des "Corepeptides"

Das isoelektrisch gefällte Peptidmaterial wurde nach Jones²⁰ über sphärisches Austauscher-Harz gereinigt. Hierbei wurde folgende Elution erhalten.

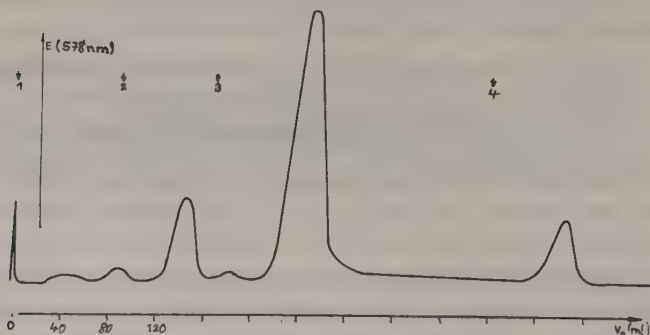


Abb. 10: Elutionsdiagramm der Reinigung des Corepeptides über sphärisches Harz. Die ausgezogene Linie gibt die Ninhydrinfärbung bei kontinuierlicher Elution wieder. An den markierten Stellen (†) wurden Gradienten angelegt (Vers. Bed. S. 46).

Gipfel I entspricht relativ reinem Core, während Gipfel II fast nur Ammoniumsalzen entspricht. Gipfel III stellt ein Peptid aus 4 Aminosäuren dar, welches aber noch relativ stark mit einem größeren Peptid verunreinigt ist. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem kurzen Peptid um ein chymotryptisch abgespaltenes Stück aus dem "Corebereich". Es konnten weitere Bruchstücke isoliert werden, die sich zwanglos zur Summenformel des gesamten Cores addieren ließen.

Aminosäure-Analysen

Die Bruttoformel der isolierten Peptide wurde nach Spackman, Stein und Moore ²² an einem automatischen Aminosäureanalysator der Firma Beckman bestimmt. Im Laufe der Arbeit wurden die meisten Peptide mehrfach isoliert. Deshalb wurde, um die Übersichtlichkeit zu wahren, in Tabelle 3, jedes Peptid nur einmal aufgeführt.

Tabelle 3 gibt die Analysenergebnisse aller rein gewonnenen tryptischen Peptide wieder.

Die Methioninwerte lagen weit unter den zu erwartenden Ergebnissen. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse von Peptiden aufgeführt, die auf Grund der erwähnten chymotryptischen Aktivität von Trypsin entstanden sind.

Zwei der Peptide liegen in unterschiedlichen Formen vor. Sie differieren jeweils in einem Aminosäurerest. Es handelt sich um die beiden Austausch Glu-Thr und Gly-Thr. Hierbei dürfte es sich um eine biologisch bedingte Heterogenität des Ausgangsmaterials handeln.

Das in der Aminosäurefolge an zweiter Stelle stehende tryptische Peptid (T_2) konnte zwar isoliert werden, war jedoch stark verunreinigt. Zur Reinigung erwiesen sich alle angewendeten Methoden als ungeeignet. Die Analysenwerte für dieses Peptid werden deshalb nicht angegeben.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	Σ	ANALYSE
Iys	1,13	(1)	1,07	1,06	1,05	0,99		1,18			1,22		1,07	0,83		10	10
His	1,80		0,99				0,88	2,02		0,79				1,93		9	8
Arg							1,02		0,94			0,84				4	4
Asp	2,03	(1)	1,23			1,12	2,08	1,40	3,10	1,92				3,69		17	15
Thr	2,03	(1)			1,05		1,04						1,93	0,87		8	9
Ser		(2)					1,21		2,29	2,21				1,93	(1)	9	9
Alu	4,97					0,99			1,34		0,82	1,99	0,96	3,25		14	13
Pro	0,90		0,92	0,99					1,01							4	4
Gly					0,91			2,09		1,23	1,07	1,12		0,57		7	8
Ala	2,03		1,92			0,90	2,84		2,22	1,85		0,95	1,07	2,46		16	15
Val	1,80	(2)					0,86	1,22	1,28	0,79				2,43		9	9
Met			++										++			2	2
Phe		(1)	0,84			0,93			0,94		0,87			1,18		6	7 - 8
Leu	1,13	(1)				1,03		3,07					1,18	1,27		8	9
Tyr		(1)											0,75	0,70		3	3
Phe		(1)			0,93	0,98	1,03	1,06		1,06		2,07		1,06		9	10
Try	++													++		2	2
Σ	19	11	8	3	4	6	11	11	12	11	4	7	8	22	1	138	137-158

Tabelle 3: Zugeordnete tryptische Peptide.

++ die entsprechenden Aminosäuren wurden durch Farbtest nachgewiesen.

T2 konnte isoliert aber nicht gereinigt werden.

T15 wurde durch AS-Bestimmung aus dem tryptischen Hydrolysat nachgewiesen.

	PC10	PC2D ₁ 2	PC2D ₁ 3	VD ₁ D ₅₀ 5A4	VD ₁ D ₅₀ 7A4	D ₁ 4A1
Lys	0,97		0,61	1,0	1,13	
His	1,06					1,07
Arg						
Asp	1,02		1,03			1,40
Thr			1,23	1,00		
Ser		1,03	1,85			1,09
Glu		0,86	2,88			2,17
Pro						
Gly	0,93	1,03	3,09	1,0		
Ala		0,86	1,03			1,31
Val						1,77
Met						
Ile				0,97		0,89
Leu					0,86	0,95
Tyr						0,70
Phe		1,20	1,23			
Try						
Summe	4	5	13	4	2	11

Tabelle 4: Nicht zugeordnete tryptische Peptide
und chymotryptische Peptide

Zuordnung der Peptide

Liegen in einer Gesamtkette n Lys und Arg vor, so wird diese durch tryptische Spaltung theoretisch in $n + 1$ Teile zerlegt. Aussagen über die Zuordnung der gewonnenen Peptide innerhalb der gespaltenen Polypeptidkette sind nach zwei Methoden möglich:

1) Durch Überlappungspeptide

Da bei enzymatischen Spaltungen von Proteinen nur in den seltensten Fällen tatsächlich die theoretisch zu erwartende Anzahl von Peptiden isoliert wird, liegt es nahe, sich notwendige Informationen über die Stellung der Peptide durch die Gewinnung ditryptischer Peptide zu verschaffen. Leider läßt sich eine statistische Blockierung einzelner NH_2 -Gruppen von Lys, bzw. Arg nicht ohne weiteres verwirklichen. Außerdem würden die Trennprobleme erheblich vergrößert werden, wenn mono, di- und tri-"tryptische" Peptide in merklichen Mengen nebeneinander vorlägen.

Die nötige Information wird daher durch neuerliche Spaltung mit einem anderen Enzym gewonnen.

2) Nach dem Homologie-Prinzip

Liegen Aminosäuresequenzen von nahe verwandten Polypeptidketten vor, so ist es möglich, die Stellung der isolierten Peptide innerhalb der Gesamtkette auf Grund von Homologien zur bereits bekannten Kette festzulegen. Dieses Verfahren wird in der vorliegenden Arbeit angewendet.

Sequenzermittlung ²⁵

Die Ermittlung der Sequenzen wurde an einem Teil der tryptischen Peptide durchgeführt. Für einige Endgruppenbestimmungen

wurde der Edman Abbau nach Shelton und Schröder am Papier durchgeführt. Alle weiteren Versuche wurden durch Edman Abbau mit Dansylchlorid nach Gray durchgeführt.

Diese Methode wurde deshalb bevorzugt, da mit wesentlich geringeren Substanzmengen und viel schneller gearbeitet werden kann.

Die Bruttoformel von CTT-X

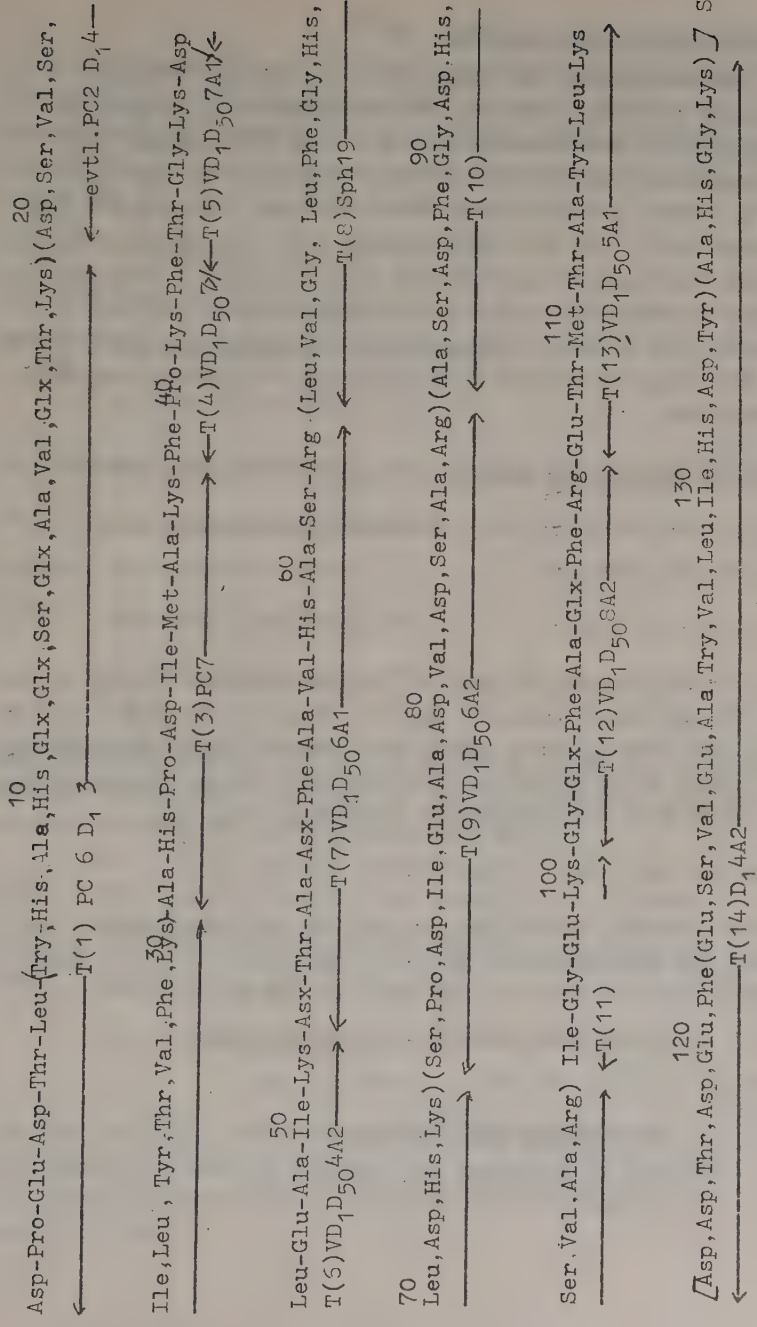
Die Tabelle Nr. 7 zeigt die Bruttoformel von CTT-X. Die tryptischen Peptide, die zur Aufstellung der Formel führten, sind eingezeichnet. Die Zuordnung der Peptide wurde auf Grund von Homologien zu CTT-I und CTT-III durchgeführt.

Das tyrosinhaltige Peptid T 2 konnte nur verunreinigt isoliert werden. Die Reinigung erwies sich mit den angewandten Methoden als unmöglich. Es wurde, wahrscheinlich durch starke Adsorptionskräfte des Austauschers, nach Rechromatographie auf Dowex 50 nicht mehr nachgewiesen.

Zur Zeichensprache

Die Proteinkette von CTT-X besteht aus 138 Aminosäuren. Diese werden fortlaufend numeriert. Waagrechte Linien mit zwei Pfeilspitzen unter der Kette geben die Größe und Zusammensetzung der isolierten, zugeordneten Peptide an. Darüber wird die systematische Bezeichnung der Peptide angegeben. Die tryptischen Peptide werden zusätzlich fortlaufend durchnummeriert. An den Stellen, wo keine Sequenzen, sondern nur die Summenformeln der Peptide vorliegen, wird dies durch Einklamern der entsprechenden Peptide verdeutlicht. Kleine Pfeile unter den Aminosäuren bedeuten, daß diese in der Sequenz des Peptides festgelegt werden konnten. Die Pfeilrichtung gibt

die Abbaurichtung an. Mehrere Pfeile geben Auskunft über die Zahl der Abbauschritte. Mehrere ineinandergesetzte Klammern bedeuten, daß an dieser Stelle Peptide gefunden wurden, die von chymotryptischer Nebenaktivität des zur Spaltung verwendeten Trypsins herrühren.



Begründung der Bruttoformel 26/27

Bei der Begründung der Bruttoformel wird bei Position 1 begonnen und bis Position 138 fortgefahren. Die Behandlung erfolgt kontinuierlich vom N- zum C-Terminus. Als N-terminales Peptid wurde TPC6D₁₃ erkannt. An der Gesamtkette wurden mit Hilfe der Dansylmethode 6 Abbauschritte durchgeführt. Bei der Untersuchung der N-terminalen Aminosäuren von isolierten Peptiden wurden zunächst die Peptide weiter sequenziert, welche Asparaginsäure N-terminal aufwiesen. Die weiteren Abbauschritte brachten den Beweis für die Stellung von TPC6D₁₃, welches aus 19 Aminosäuren aufgebaut ist.

Asp-Pro-Glu-Asp-Thr-Leu(Try,His,Ala,His,Glx,Glx,Ser,Glx,

← T(1)TPC6D₁₃ →

Ala,Val,Glx,Thr,Lys)

Das in der Sequenz an zweiter Stelle stehende Peptid konnte nur verunreinigt isoliert werden. Deshalb war weder ein Abbau noch eine sichere Angabe der Aminosäurezusammensetzung auf diese Weise möglich. Die wahrscheinliche Zusammensetzung von T(2) kann folgendermaßen angegeben werden:

(Asp,Ser,Val,Ser,Ile,Leu,Tyr,Thr,Val,Phe,Lys)

Als das dritte Peptid in der Sequenz von CTT-X wurde, auf Grund der Ähnlichkeiten zu CTT-I und CTT-III, TPC₂₇ angenommen.

CTT-I ³⁵Ala-Asx-Pro-Asx-Ile-Glx-Thr-Ala-Phe

CTT-III Ala-Asp-Pro-Ser-Ile-Met-Ala-Lys

CTT-X Ala-His-Pro-Asp-Ile-Met-Ala-Lys

← T(3)TPC₂₇ →

Da die gesamte Kette nur 2 methioninhaltige Peptide aufwies, war die Wahrscheinlichkeit daß TPC₂₇ diesem Bereich zuzuordnen ist, sehr hoch. Nachdem die Peptide TVD_{1D50}^{7A3} und TVD_{1D50}^{7A1} isoliert und sequenziert waren, lag es nahe, diese als T(4) und T(5) zuzuordnen.

CTT-I ⁴⁰ Phe-Ser-Glx-Phe-Ala-Gly-Lys ⁴⁵

CTT-III Phe-Pro-Glu-Phe-Ala-Gly-Lys

CTT-X Phe-Pro-Lys-Phe-Thr-Gly-Lys

←TVD_{1D50}^{7A3}←TVD_{1D50}^{7A1}→

Anschließend wurde das Peptid VD_{1D50}^{4A2} gestellt.

CTT-I ⁵⁰ Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Lys

CTT-III Asp-Leu-Glu-Ser-Ile-Lys

CTT-X Asp-Leu-Glu-Ala-Ile-Lys

←T(6)VD_{1D50}^{4A2}→

Das siebente tryptische Peptid wurde in VD_{1D50}^{6A1} erkannt, nachdem es isoliert, analysiert und bis auf die letzten beiden Aminosäuren durchsequenziert war.

CTT-I ⁵⁵ Gly-Thr-Pro-Asx-Phe-Ser-Lys-Ala-His-Gly-Arg ⁶⁰

CTT-III Gly-Thr-Ala-Pro-Phe-His-Thr(Glu, Ala, Asn)Arg

CTT-X Asx-Thr-Ala-Asx-Phe-Ala-Val-His-Ala-Ser-Arg

←T(7)VD_{1D50}^{6A1}→

Die Stellung der Peptide T(1) bis T(7) außer T(2) kann als sicher betrachtet werden. Sie wurden rein isoliert und ihre Aminosäurefolge konnte fast gänzlich aufgeklärt werden. (*folge)

Für die folgenden Peptide T(8), T(9) und T(10) kann für die Zuordnung nur eine gewisse Ähnlichkeit der Bruttoformeln zu den entsprechenden Bereichen von CTT-I und CTT-III angeführt werden.

70

CTT-I Val-Val-Gly-Leu-Phe-Ser-Glx-Met-Asp-Leu-Leu-Gly-
 CTT-III Ile-Val-Gly-Phe-Phe-Ser-Lys-Leu-Ile-Gly-Glu(Ile,
 CTT-X (Leu,Val,Gly,Leu,Phe,Gly,His,Leu,Asp,His,Lys)(Ser,

← T(8) Sp^h 19 →

80

CTT-I Asn-Asp-Ala-Asn-Pro-Thr-Thr-Ile-Leu-Ala-Lys-Ala-
 CTT-III Pro,Asn,Ile,Glu)Ala-Asp-Val-Asn-Thr-Phe(Lys,Ala,
 CTT-X Pro,Asp,Ile,Glu,Ala,Asp,Val,Asp,Ser,Ala,Arg)(Ala,

← T(9) VD₅₀ 6 A2 →

90

CTT-I Lys-Asp-Phe-Gly-Lys-His-Ser-Lys-Ser Arg-Ala-
 CTT-III Ser, his,Val,Pro) Arg-Gly-Val-
 CTT-X Ser,Asp,Phe,Gly,Asp,His,Ser,Val,Ala,Arg)Ile-Gly-

← T(10) VD₅₀ 6 →

CTT-I Ser-Pro-
 CTT-III Thr-His-
 CTT-X Glu-Lys-
 T(11) VD₅₀ 5 A3 →

Zu Peptid T(12) verbleibt nach obiger Anordnung eine Lücke von 4 Aminosäuren, die durch T(11) gefüllt wurde. Für die Zuordnung an diese Stelle gibt es keine Hinweise. Sie könnte ebenso zwischen T(8) und T(9) oder T(9) und T(10) erfolgen.

Das Peptid TVD₁D₅₀^{8A2} wurde, nachdem seine Aminosäuresequenz bestimmt war als T(12) zugeordnet.

CTT-I Ala-Ser-Pro-Ala-Glx-Leu-Asx-Asx-Phe-Arg

CTT-III Gly-**Val**-Thr-His-Asx-Glx-Leu-Asx-Asn-Phe-Arg

CTT-X Gly-Glx-Phe-Ala-Glx-Phe-Arg

←T(12)VD₁D₅₀^{8A2}→

Das Peptid VD₁D₅₀^{5A1} wurde, obwohl hier die Homologien zu den vergleichbaren CTT-Hämoglobinen nicht so groß sind, wie bei den vorangegangenen Peptiden, als T(13) zugeordnet, da die Ähnlichkeiten an besonders markanten Stellen zu finden sind.

CTT-I Lys-Ser-Leu-Val-Val-Tyr-Leu-Lys

CTT-III Ala-Gly-Phe-Val-Ser-Tyr-Met-Lys

CTT-X Glu-Thr-Met-Thr-Ala-Tyr-Leu-Lys

←T(13)VD₁D₅₀^{5A1}→

Außerdem konnte auf Grund chymotryptischer Aktivitäten des zur Spaltung verwendeten Trypsins, das Peptid VD₁D₅₀^{7A4} isoliert werden. Chymotrypsin spaltet bevorzugt hinter Tyr, Phe und sonstigen hydrophoben Aminosäuren.

An T(13) schließt sich ein 22 Aminosäuren langes Peptid an. Dieses wird auf Grund seiner Schwerlöslichkeit als "Core" bezeichnet. Es konnte in reiner Form isoliert werden. Außerdem liegen 2 chymotryptische Peptide dieses Bereichs vor. Deshalb wurde das gesamte Peptid in eckige Klammern und die dazugehörigen Bruchstücke in runde Klammern geschrieben.

[Asp, Asp, Thr, Asp, Glu, Phe(Glu, Ser, Val, Glu, Ala, Try, Val, Leu, Ile, His, Asp, Tyr(Ala, His, Gly, Lys)] T(14) D₁4A1

Als fünfzehntes tryptisches Peptid müßte das C-terminale ohne Lys oder Arg-Rest folgen. Es konnte lediglich freies Serin isoliert werden, sodaß:

T(15) - Ser

Diskussion

Über mögliche Fehlerquellen

Viele Einzelergebnisse wurden gesammelt und schließlich zur vorgelegten Bruttoformel zusammengesetzt. Sowohl die Einzelergebnisse, als auch die Schlüsse die zum Gesamtergebnis geführt haben, bedürfen einer kritischen Betrachtung:

Sämtliche quantitativen Aminosäure-Analysen wurden nach der Methode von Stein und Moore durchgeführt. Diese Methode ist eine der sichersten Bestimmungsmethoden für Aminosäuren. Der auftretende Fehler liegt unter 5 Prozent. Von den meisten der Peptide wurden mehrere Analysen durchgeführt. Bei den einfach durchgeführten Analysen könnten theoretisch Fehler auftreten. Die Wahrscheinlichkeit für derartige Fehler ist gering, da die Analyse bereits den Charakter einer Mehrfachbestimmung aufweist, bei der mehrere Aminosäuren unter identischen Bedingungen nacheinander bestimmt werden. Größere Verfälschungen der Analysenergebnisse können eintreten, wenn die vorliegenden Peptide oder Proteine selbst nicht den Reinheitsforderungen entsprechen. Deshalb wurden alle Peptide vor der Analyse auf Einheitlichkeit geprüft. Die Tests auf Einheitlichkeit wurden durch Chromatographie an Papier oder Dünnschicht-Cellulose-Platten durchgeführt. Bei der üblichen Hydrolysezeit von 20 Stunden kann es vorkommen, daß bestimmte Bindungen im Peptid nicht aufgehen, oder daß einige der Aminosäuren teilweise zerstört werden. Durch verlängerte Hydrolysezeiten konnte der erste Fehler in jedem Fall beseitigt werden. Da die Zerfallskonstanten ²⁸ der Aminosäuren bei der sauren Hydrolyse bekannt sind, stellt außer bei Tryptophan, welches quantitativ zerstört wird, diese Fehlermöglichkeit kein Problem dar. Tryptophan konnte in beiden Peptiden durch spezifische Farbreagenzien nachgewiesen werden.

Die größte Fehlermöglichkeit liegt, was bereits über die Aufstellung der Bruttoformel hinausgeht, beim Abbau der Peptide

nach Edman oder bei der Dansyl-Methode.

Bei den Papierchromatogrammen^{ep} der PTH-Aminosäuren und den Chromatogrammen der Dansylaminosäuren auf Polyamid-Dünnschichtplatten sind Fehlinterpretationen denkbar. Um die Ergebnisse abzusichern, wurden die Bestimmungen an den einzelnen Peptiden mehrfach durchgeführt. Bei kurzen Peptiden wurde eine zusätzliche Bestätigung der Ergebnisse dadurch erreicht, daß nach vollständigem Abbau des Peptides alle nach der Analyse zu erwartenden Aminosäuren gefunden wurden.

Zur Problematik der Isolierung von Hämoglobinen aus Zuckermückenlarven

Wie bei den meisten der Invertebraten liegen die Hämoglobine bei thummi frei in der Hämolymphe vor. Bei den Chironomiden wurde im Gegensatz zu den meisten anderen Wirbellosen eine Vielzahl sehr unterschiedlicher Hämoglobine gefunden. Diese unterscheiden sich in ihren Primärstrukturen zum Teil erheblich.

Außerdem zeigte sich bei den vielen nötigen Aufarbeitungen von Mückenlarven, daß die einzelnen Hämoglobine in unterschiedlicher Menge, bezogen auf die Gesamtausbeute, vorlagen. Es ist denkbar, daß die Mückenlarven mit fortschreitendem Alter einige der Hb's bevorzugt produzieren und andere weniger. Genaue Aussagen darüber können nicht gemacht werden.

Zur Reindarstellung von CTT-X

Die dimer vorliegenden Hämoglobine aus thummi werden über DEAE-Cellulose chromatographisch getrennt. Hierbei wurde CTT-X in zwei getrennten Banden eluiert. In einem Fall zeigte sich bei allen angewandten Tests eine starke Verunreinigung

durch CTT-IX, während im anderen Fall einheitliches Hämoglobin gewonnen wurde. Hier zeigten Elektrophoresen an vertikalen Polyacrylamidgelen scharfe, gut zuordenbare Banden. Die Bestimmung des C-Terminus ergab nur Serin. Dies bedeutet jedoch kein Reinheitskriterium, da die möglichen Verunreinigungen ebenfalls Serin am Carboxylende aufweisen. Der N-Terminus unterscheidet sich dagegen von den anderen Hämoglobinen und stellt somit einen Hinweis auf Einheitlichkeit des Hämoglobins dar. Nachdem nur Asparaginsäure gefunden werden konnte, wurde angenommen, daß relativ reines Hb zur Weiterverarbeitung vorlag.

Im Verlauf der Peptidtrennung wurden die meisten Peptide mehrfach isoliert. Die Analysenwerte stimmen bei den meisten der Peptide überein. Bei einigen wurden jedoch unterschiedliche Ergebnisse gefunden.

Zum Beispiel:

	Lys	His	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Phe
VD ₁ D ₅₀ ¹⁰	1,03	1,98	0,99	<u>0,90</u>	<u>1,08</u>	0,99	3,01	0,97
Sph 19	1,18	2,02	1,04	<u>-</u>	<u>2,09</u>	1,22	3,07	1,06

Ile-Gly-Glu-Lys

Ile-Gly-Thr-Lys

Die Differenzen lassen sich auf verschiedene Weise erklären. Es ist denkbar, daß die verwendeten Reinheitskriterien nicht ausreichend waren, und daß somit das zur Spaltung gelangte Material durch Proteine fast identischer Sequenz verunreinigt war. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß bereits bei der Bildung einzelner Polypeptidketten durch die Heterogenität des genetischen Materials unterschiedliche Endprodukte produziert werden, die sich nur in einzelnen Positionen un-

terscheiden. In diesem Falle ist es schwierig, die bereits geschilderten Reinheitskriterien anzuwenden, da auf Grund identischer Ladungen eine Trennung über Ionen-Austauscher nicht möglich ist. Eine Aufspaltung nach Molekulargewichten ist, da sich diese nur minimal unterscheiden, ebenfalls unmöglich. Die einzigen Hinweise auf Reinheit wurden in derartigen Fällen durch die quantitative AS-Analyse, bzw. durch Sequenzanalysen gegeben.

Zum anderen erhebt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob es sinnvoll ist, Proteine vor der Weiterverarbeitung absolut zu reinigen, sie von so nahe verwandten Ketten zu befreien. In den meisten Fällen lassen sich die auftretenden Probleme im Rahmen von Sequenzanalysen lösen und die unterschiedlichen Möglichkeiten klären.

Darüberhinaus muß abgewogen werden, ob der Zeit- und Materialaufwand zur "Ultrareinigung" von Proteinen durch später zu bewältigende Probleme geboten ist.

Zum Ergebnis

In Tabelle 8 wird die Formel von CTT-X in den festgelegten Positionen mit den Primärstrukturen von CTT-I und CTT-III verglichen. Die Bruttoformel der Ketten des Menschenhämoglobins werden zum Vergleich mitangeführt.

Werden nur die ersten 62 AS der Sequenzen verglichen, so zeigt sich, daß die Homologien in diesem Bereich relativ häufiger sind, als in dem übrigen Teil der Ketten. Beim Vergleich der Aminosäurefolgen bei CTT-I, ¹² CTT-III, ²⁷ CTT-IV ²⁹ und CTT-X im Bereich von 1 bis 62 ergab sich, daß

zwischen CTT-I	und CTT-III	28 Austausche,
zwischen CTT-I	und CTT-X	36 Austausche,
zwischen CTT-IV	und CTT-X	35 Austausche und
zwischen CTT-III	und CTT-X	31 Austausche

vorliegen.

CTT-X	Asp-Pro-Glu-Asp-Thr-Leu(Try, His, Ala, His, Glx, Ser, Glx, Ala, Val, Glx, Thr, Lys)
CTT-III	Leu-Ser-Ala-Asp-Gln-Ile-Ser-Thr-Val-Glx-Ala-Ser-Phe-Asp-Lys-Val-Lys-Gly-
CTT-I	Gly-Pro-Ser-Gly-Asp-Glu-Ile-Ala-Ala-Lys-Ala-Ser-Trp-Asn-Thr-Val-Lys-Asn-
α	Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Trp-Gly-Lys-Val-Gly-Ala-His-Ala-Gly-Glu-

B

CTT-X	(Asp, Ser, Val, Ser, Ile, Leu, Tyr, Thr, Val, Phe, Lys)Ala-His-Pro-Asp-Ile-Met-Ala-Lys-Phe-Pro-Lys-
CTT-III	Asp-Pro-Val-Gly-Ile-Leu-Tyr-Ala-Val-Phe-Lys-Ala-Asp-Pro-Ser-Ile-Met-Ala-Lys-Phe-Pro-Gln-
CTT-I	Asn-Gln-Val-Asx-Ile-Leu-Tyr-Ala-Val-Phe-Lys-Ala-Asx-Pro-Asx-Ile-Glx-Thr-Ala-Phe-Ser-Glx-
α	Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Ser-Phe-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-

C

CD

CTT-X	Phe-Thr-Gly-Lys-Asp-Leu-Glu-Ala-Ile-Lys-Asx-Thr-Ala-Asx-Phe-Ala-Val-His-Ala-Ser-Arg(Leu,
CTT-III	Phe-Ala-Gly-Lys-Asp-Leu-Glu-Ser-Ile-Lys-Gly-Thr-Ala-Pro-Phe-His-Thr(Glu, Ala, Asn)Arg-Ile-
CTT-I	Phe-Ala-Gly-Lys-Asp-Leu-Asp-Ser-Ile-Lys-Gly-Thr-Pro-Asx-Phe-Ser-Lys-Ala-His-Gly-Arg-Val-
α	Phe-Asp-Leu-Ser-His-

D

E

CTT-X	Val, Gly, Leu, Phe, Gly, His, Leu, Asp, His, Lys(Ser, Pro, Asp, Ile, Glu, Ala, Asp, Val, Asp, Ser, Ala, Arg)
CTT-III	Val-Gly-Phe-Phe-Ser-Lys-Leu-Ile-Gly-Glu(Ile, Pro, Asn, Ile, Glu)Ala-Asp-Val-Asn-Thr-Phe(Lys,
CTT-I	Val-Gly-Leu-Phe-Ser-Glx-Met-Asp-Leu-Leu-Gly-Asn-Asp-Ala-Asn-Pro-Thr-Thr-Ile-Leu-Ala-Lys-
α	Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asp-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-

F

F

90

100

CTT-X	(Ala, Ser, Asp, Phe, Gly, Asp, His, Ser, Val, Ala, Arg) Ile-Gly-Glu-Lys-Gly-Glx-Phe-Ala-Glx-Phe-Arg-	
CTT-III	Ala, Ser,	His, Val, Pro)
CTT-I	Ala-Lys-Asp-Phe-Gly-Lys-His-Ser-Lys-Ser-	Arg-Ala-Ser-Pro-Ala-Glx-Leu-Asx-Asx-Phe-Arg-
α	Asp-Leu-	His-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-
		FG
		G

110

CTT-X	Glu-Thr-Met-Thr-Ala-Tyr-Leu-Lys(Asp, Asp,	Thr, Asp, Glu, Phe, Glu, Ser, Val, Glu, Ala,
CTT-III	Ala-Gly-Phe-Val-Ser-Tyr-Met-Lys-Ala-His-	Thr-Asp-Phe-Gly-Ala-Glu-Ala- Ala-Ala-
CTT-I	Lys-Ser-Leu-Val-Val-Tyr-Leu-Lys-Gly-Ala-	Thr-Lys(Asp, Glu, Ala, Val) Ser, Ser, Pro, Ala,
α	His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-	
		GH
		H

120

CTT-X	Try, Val, Leu, Ile, His, Asp, Tyr, Ala, His, Gly, Lys) Ser.	
CTT-III	Try-Gly-Thr(Leu, Ala) Asp-Thr-Phe-Phe-Gly-Met-Ile-Phe-Ser-Lys-Met	
CTT-I	Try, Val, Leu) Asp, Phe, Val, Phe) Ser-Thr-Leu-Lys-Asx-Glx-Leu	
α	Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg-	

Außerdem kann bereits abgeschätzt werden, daß sich CTT-III und CTT-IV lediglich in ca. 20 Aminosäureresten unterscheiden.

Auf Grund der Homologien zwischen den einzelnen Hämoglobinen kann eine Reihe aufgestellt werden, die die genetische Distanz wiedergibt.

CTT-I CTT-IV CTT-III CTT-X

Hierbei wurde CTT-X als "Bezugspunkt" gewählt und alle anderen, entsprechend den Homologien innerhalb der ersten 62 Positionen, links davon geschrieben. Demnach ist die Distanz CTT-X zu CTT-I am größten, dann folgen CTT-IV und CTT-III. Diese Reihenfolge sagt zunächst nichts über die Entwicklung, oder gar über die Reihenfolge ihrer Entstehung aus. Derartige Aussagen sind erst dann möglich, wenn sowohl die vollständigen Sequenzen, genaue Kenntnisse über die Tertiärstrukturen, als auch entscheidende physikalisch-chemische Daten vorliegen. Versuche zu Aussagen zu kommen können vorgenommen werden, indem man vergleicht, welche der bei Vertebraten invarianten Aminosäuren sich an entsprechenden Stellen befinden. Diese Vergleiche führen aber nicht zum gewünschten Ergebnis, da die entsprechenden Seitenketten bei den bisher untersuchten CTT-Hb's nur selten austauschen unterliegen. Dagegen könnte der Vergleich derjenigen Aminosäuren, die innerhalb der Kette befähigt sind, Kontakte zum Häm zu bilden, Aussagen über besondere Funktionen der Hb's oder deren Verwandtschaft zu anderen Hämoglobinen Auskunft geben. In Tabelle 9 werden die bei Globinen vorkommenden Hämkontakte nach Perutz³⁰ aufgezeichnet. Die Daten von CTT-I und III wurden nach Neuwirth²⁶ eingesetzt. Die Tabelle wird geführt über die Positionen 1 - 62 und 100 - 114.

Tabelle der Hämkontakte:

	Mb	a	β	Lp.	CTT-X	CTT-III	CTT-I
B 13	Leu	Met	Leu	Phe	Val	Val	Val
C 4	Thr	Thr	Thr	Ala	Ile	Ile	Ile
C 7	Lys	Tyr	Phe	Phe	Lys	Lys	Ala
CD 1	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
CD 3	Arg	His	Ser	Lys	Lys	Glu	Glx
CD 11	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe	Phe
E 7	His	His	His	His	His	Glu	Ala
E 10	Thr	Lys	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg
G 4	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Glx	Glx	Glx
G 5	Leu	Phe	Phe	Phe	Phe	Leu	Leu
G 8	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Phe	Phe

Obige Tabelle zeigt, daß die Hämbindung innerhalb der gesamten Kette - obwohl diese nur zum Teil vorliegt - anders stattfinden muß, als bei CTT-I und CTT-III, da hier bereits das Histidin in Position E 7 vorliegt.

Ebenso liegen Unterschiede in den Positionen CD 3 und G 5 vor, die CTT-X näher zum Lampetra Hämoglobin rücken lassen, als zu I oder III.

Experimenteller Teil

Aufarbeitung der Zuckmückenlarven ¹⁸

Die Larven wurden von den Tetrarwerken bezogen. Bis zur Aufarbeitung wurden sie bei -20°C aufbewahrt. Die Chironomuslarven wurden mit 0,005 m Kaliumphosphatpuffer von pH 8,6, dem 100 mg Kaliumcyanid je Liter zugesetzt waren, homogenisiert. Dieser Vorgang wurde bei 4°C rasch durchgeführt. Anschließend wurde 45 Minuten bei 4°C mit 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 200 g Ammoniumsulfat je Liter behandelt. Hierbei werden verunreinigende Proteine ausgefällt. Nachdem 20 Minuten bei 4°C stehengelassen wurde, wird abermals mit 12000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Nutsche filtriert und anschließend an einer Sephadex G 25 Säule chromatographisch entsalzt. Der verwendete Puffer von pH 7,6 enthält 0,005 m Kaliumphosphat und 100 mg/l KCN. Die erhaltene Hämoglobinlösung wurde durch Druckdialyse oder durch Gefriertrocknung eingeengt und konnte tiefgekühlt aufbewahrt werden.

Trennung der monomeren von den dimerisierenden Hämoglobinen

Die Vortrennung monomerer und dimerer Hämoglobine erfolgt über Sephadex G 75 super fine. Verwendet wurde der gleiche Puffer wie bei obiger Chromatographie. Die Arbeitstemperatur betrug 4°C . Hierbei wurden die dimeren Hämoglobine auf Grund ihres doppelten Molekulargewichtes zuerst eluiert, anschließend die monomeren.

Durch Gefriertrocknung wurden beide Fraktionen eingeengt.

Auftrennung des Dimeren-Gemisches

Die Auftrennung der Hämoglobine wurde chromatographisch an DEAE-Cellulose-Austauschern durchgeführt. Die Arbeitstemperatur war 4°C. Eine Chromatographie nahm bis zu drei Wochen in Anspruch. Es wurden kombinierte pH und Ionengradienten angewendet. Die lyophilisierten Hämoglobine wurden in 0,005 m Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,6 gelöst (1 g in ca. 10 cm) und anschließend über Nacht gegen den Lösungspuffer dialysiert.

Die Chromatographie erfolgte auf einer DEAE-Cellulose Säule, die 30 cm lang und 5 cm weit war. Die Säule war mit dem ersten Elutionspuffer äquilibriert. Zur Trennung gelangten jeweils ca. 2 g Dimerengemisch. Die Lösung wurde auf die Säule gebracht und folgendes Gradientensystem angeschlossen. Vor der Säule befand sich ein Mischgefäß mit 1000 ccm Elutionspuffer 1. Hinter dieses Mischgefäß wurden 5 l Gefäße mit den jeweiligen Elutionspuffern (1 bis 5) geschaltet. Es wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 cc pro Stunde eluiert und alle 20 Minuten eine Fraktion abgenommen.

Auftragspuffer:

0,005 m Kaliumphosphat pH 8,6 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol

Elutionspuffer:

- 1) 0,005 m Kaliumphosphat pH 8,0 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol
- 2) 0,01 m Kaliumphosphat pH 8,0 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol
+ 0,04 m KCl
- 3) 0,02 m Kaliumphosphat pH 6,8 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol
+ 0,4 m KCl

- 4) 0,02 m Kaliumphosphat pH 6,8 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol
+ 0,1 m KCl
- 5) 0,02 m Kaliumphosphat pH 6,8 + 100 mg KCN/l
+ 1 ccm/l Thiodiglykol
+ 0,5 m KCl

Die gesamten Fraktionen wurden photometrisch bei 546 nm vermessen.

Reinigung von CTT-X

CTT-X wurde bei obiger Chromatographie in 2 Banden eluiert. Die erste enthält reine Komponente X, die zweite ist durch Komponente IX im Verhältnis 1 : 1 verunreinigt. Durch Chromatographie über Sephadex G 75 s.f. konnte der größte Teil von CTT-X rein isoliert werden.

Säulenlänge: 1 m

Puffer: 0,01 m Na-Acetat

Säulendurchmesser: 5 cm

Durchflußgeschwindigkeit: 50 n/h

Fraktionsgröße: 12,5 n

Das gewonnene CTT-X wurde 24 h gegen destilliertes Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Enzymatische Spaltung

Trypsin

Das Enzym wurde von der Firma Serva bezogen. Zur Beseitigung chymotryptischer Aktivitäten wurde mit TPCK⁺ umgesetzt.

Tryptische Spaltung des Globins ⁷

Die tryptische Hydrolyse wurde nach Liebold und Braunitzer mit geringen Abwandlungen durchgeführt.

Spaltbares Material:	600 mg Globin von CTT-X
Lösungsmittel:	30 ml Wasser nach der Lösung mit 0,1 NNaOH auf pH 8 titriert
Denaturierung:	10 Min. in siedendem Wasserbad, anschließend Abkühlung im Eisbad
Gerät:	Autotitratator der Fa. Radiometer
Spaltzeit:	3 Stunden, dann nach erneuter Trypsinzugabe abermals 3 Stunden
Trypsinkonzentration:	1 %ig, pro Zugabe je 6 mg
Temperatur:	37 - 38°C
NaOH-Zugabe:	0,5 m NaOH, 1,583 ml
Beendigung der Spaltung:	Verdünnen, einfrieren mit CO ₂ Acetongemisch und anschließende Gefriertrocknung.

Isolierung und Reinigung der Peptide

Die Isolierung einzelner Peptide aus den vorliegenden Hydrolysaten und die anschließende Reinigung derselben wurde chromatographisch an verschiedenen Ionenaustauschern, an Sephadex, auf Papier und Dünnschicht-Cellulose-Platten durchgeführt. Die Qualität der Trennung ist bei Säulenchromatographien vom gleichmäßigen Durchfluß der verwendeten Puffer durch die Säulen abhängig. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muß außerdem die Temperatur während der Chromatographie konstant gehalten werden. Bei der Füllung der Säulen wird üblicherweise folgendermaßen verfahren: Zuerst wird das

Rohr mit Äquilibriumspuffer aufgefüllt, während dieser ausläuft, wird langsam der im Puffer aufgeschlämmte Austauscher aufgefüllt. Konstante Durchflußgeschwindigkeit wird erreicht, indem eine Präzisionspumpe zwischengeschaltet wird. Um Gasblasenbildung zu vermeiden wird eine Blasenfalle vorgeschaltet und zusätzlich mit geringem Überdruck gearbeitet. Die Gradienten werden in geschlossenen Mischgefäßen bereitet, indem mehrere stets stärkere Puffer nacheinander an das gleiche Mischgefäß angeschlossen werden. Die Fraktionierung des Eluats geschieht mit einem Fraktionssammler.

Die Fraktionsgröße lag immer zwischen 4 und 7 ml.

Bei den meisten Trennungen wurde dem Eluat kontinuierlich ein Aliquot entnommen, mit Ninhydrinlösung vermischt, in einem Heizbad erhitzt und die Färbung automatisch registriert.

In den restlichen Fällen wurde jeder Fraktion - um die Farbreaktion durchzuführen - ein Aliquot entnommen. Diese wurden mit 1 ml 2,5 N Natronlauge 2,5 Stunden bei 110°C hydrolysiert. Anschließend erfolgte die Neutralisation mit 1 ml 30 %iger Essigsäure.

Die Farbreaktion wurde nach Zugabe von 1 ml Ninhydrinreagenz 15 Minuten bei 100°C durchgeführt. Je nach Farbintensität wurde mit 50 %igem Äthanol verdünnt. Die Reaktionskurven wurden im Eppendorf-Photometer bei 578 nm gemessen und durch einen Punktschreiber registriert.

Chromatographie an Ionenaustauschern

Die Auftrennung des tryptischen Hydrolysats wurde zunächst über phosphorylierte Cellulose versucht. Rechromatographiert wurde über Dowex 1 x 2. Hierbei konnte eine Anzahl von Peptiden nicht isoliert werden. Deshalb wurde eine Vortrennung über Dowex 1 x 2 mit einem Puffer hoher Ionenkonzentration durchgeführt. Anschließend wurde über Dowex 50 rechromato-

graphiert. War das Ergebnis noch immer ungenügend, so schloß sich eine Chromatographie über Animex Q 15, bzw. Papier oder Cellulose-Platten an.

Die verwendeten Ionenaustauscher wurden wie folgt aufbereitet:

Phosphorylierte Cellulose

Phosphorcellulosepulver wurde nach Quellung in Wasser durch Dekantieren von kleinen Teilen befreit. Dann wurde mit 0,5 n HCl behandelt und mit destilliertem Wasser neutral gewaschen. Nun wurde der Austauscher so oft mit Äquilibriumspuffer suspendiert und abdekantiert, bis der Überstand klar blieb. Jede Säulenfüllung ist mehrfach verwendbar und kann nach dem Lauf regeneriert werden.

Dowex 50 x 2

Die Dowex 50 Säulen wurden bei 50°C gefüllt. Sie wurden nur einmal benutzt, da das Harz bei steigender Ionenstärke schrumpft und beim Äquilibriumspuffern Risse auftreten können. Das Harz wurde mit 2 n Salzsäure behandelt, mit Wasser neutral gewaschen und mit 2 n Natronlauge in die Na-Form übergeführt. In dieser Form wurde im Äquilibriumspuffer aufgeschlämmt.

Sphärisches Harz PA-28 ²⁰

Dieses Harz wird behandelt wie Dowex 50 x 2. Es schrumpft auf Grund höherer Vernetzung nicht stark und kann mehrfach benutzt werden.

Die Säulenmaße betragen bei den Füllungen mit:

	Länge	Durchmesser
phosphorylierter Cellulose	15 cm	14 mm
Dowex 1 x 2	10 cm	9 mm
Sphärischem Harz	50 cm	9 mm

Zur Chromatographie an Kationenaustauschern wurden folgende Puffer verwendet:

Äquilibrierpuffer: 1

- 1) 0,1 m pH 3,05 : 32 ml Pyr + 800 ml HAc ad 4000 ccm
- 2) 0,4 m pH 3,50 : 128 ml Pyr + 880 ml HAc ad 4000 ccm
- 3) 1,07 m pH 4,65 : 344 ml Pyr + 360 ml HAc ad 4000 ccm
- 4) 2,0 m pH 5,6 : 684 ml Pyr + 180 ml HAc ad 1000 ccm

Dowex 1 x 2

Der Austauscher liegt neu in Chloridform, gebraucht in der Acetatform vor. Er muß in möglichst reine Acetatform überführt werden. Dazu wird das Harz mit 0,5 n Natronlauge gewaschen, bis kein Chlorid mehr nachweisbar ist. Danach wird mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und in 1 n Essigsäure in die Acetatform überführt. Anschließend wird mit destilliertem Wasser neutral gewaschen und mit Äquilibrierpuffer aufgeschlämmt.

Animex Q 15

Bei diesem Harz wird entsprechend obiger Vorschrift verfahren.

Die Maße der verwendeten Säulen betragen:

	Länge	Durchmesser
bei Animex	45 cm	0,9 cm
	12 cm	0,9 cm
bei Dowex 1 x 2	50 cm	0,9 cm
	12 cm	0,9 cm

Für die Chromatographie wurden folgende Puffer verwendet:

Pyridinpuffer für Anionenaustauscher

Äquilibrierpuffer: 1

Grad. 1) pH 9,5	30 ccm Morpholin
	40 ccm Picolin
	20 ccm Pyridin
	0,25 ccm Eisessig
auffüllen ad 2 l	
Grad. 2) pH 8,6 wie oben	1,75 ccm Eisessig
Grad. 3) pH 7,2 wie oben	14,15 ccm Eisessig
Grad. 4) pH 6,0 wie oben	30,8 ccm Eisessig
Grad. 5) pH 3,9 wie oben	240,0 ccm Essigsäure 2 molar

Gelfiltration

Die Komponenten IX und X von CTT können Dimere des Typs a/β bilden. Um diese zu trennen, wurde über Sephadex G 75 chromatographiert.

Sephadex G 75 wurde in der Säule (1 : 1 m x Ø: 5 cm) mit 0,1 m Natriumacetat von pH 6,5 so lange äquilibriert, bis Eluat und aufgegebener Puffer gleiche Leitfähigkeit aufwiesen. Hierzu wurden ca. 10 l Puffer verwendet. Die Fraktionierung während der Elution wurde mit einem Fraktionssammler durchgeführt. Alle 30 Minuten wurden 15 ml gesammelt.

Chromatographie auf Papier und Dünnschicht-Cellulose-Platte

Manche Peptide konnten durch Säulenchromatographie nicht rein erhalten werden. Mit diesen wurden präparative Chromatographien auf Papier oder Cellulose-Platten durchgeführt. Auf Papier (Whatman Nr. 2 60 x 60 cm) wurden ca. 0,8 nmol, auf Platte (Schleicher und Schüll 20 x 20 cm) wurden ca. 0,5 nmol aufgetragen. Das Auftragen erfolgte auf jeweils 15 schmale Striche. Papier wurde im absteigenden Partridge System, Platten im aufsteigenden, modifizierten Baglioni-System chromatographiert.

Durch Anfärben der Ränder mit Ninhydrinreagens wurde die Laufstrecke der Peptide ermittelt. Die entsprechenden Streifen wurden ausgeschnitten und mit 30 %iger Essigsäure die Peptide daraus eluiert.

Die Chromatographiesysteme sind:

Partridge: n-Butanol/Wasser/Eisessig (4 : 5 : 1)

Baglioni modifiziert: n-Butanol/Pyridin/Wasser/Eisessig
(3 : 3 : 3 : 1)

Fällung eines Peptides am isoelektrischen Punkt

Besondere Schwierigkeiten treten bei der Isolierung und Reinigung des sogenannten Corepeptides auf. Deshalb wurde das Gemisch der tryptischen Peptide, das in Ammoniumbicarbonatlösung vorlag, zunächst langsam mit Essigsäure bis auf pH 6,3 titriert. An dem isoelektrischen Punkt fällt das Peptid quantitativ aus. Durch Zentrifugation bei 16000 U/min (Eppendorf-Zentrifuge) wurde das Präzipitat aus der Lösung entfernt. Der Überstand enthielt alle anderen Peptide. Bei der Fällung werden meist noch einige andere Peptide aus der Lösung "geschleppt". Deshalb wurde mehrmals mit einer 0,1 m Ammoniumbicarbonatlösung von pH 6,3 gewaschen und anschließend zentrifugiert. Die weitere Reinigung erfolgte chromatographisch.

Edmanabbau mit Dansylchlorid ²⁵

Bei dieser Methode wird folgendes Prinzip angewandt: Man markiert die N-terminale AS eines Aliquots der Substanz mit Dansylchlorid. Die markierte Peptid- oder Proteinmenge wird sauer hydrolysiert und aus dem Hydrolysat die markierte Endgruppe bestimmt. Die Endgruppenbestimmung ist sehr empfindlich und kann bereits mit 10^{-11} - 10^{-12} Mol des Peptids durchgeführt werden. Für den nächsten Endgruppennachweis, muß zuerst von der gesamten Peptidmenge die eben nachgewiesene Aminosäure entfernt werden. Dies geschieht durch Edmanabbau.

Anschließend kann abermals an einem Aliquot der Lösung eine Endgruppenbestimmung durchgeführt werden.

Zu 20 μ l wässriger Peptidlösung werden 20 μ l 0,2 m NaHCO_3 -Lösung, 20 μ l 0,2 m Na_2CO_3 -Lösung und 20 μ l Dansylchloridlösung (20 mg/ml in Aceton) zugegeben und 30 Minuten im Dunklen aufbewahrt (Dansylaminosäuren sind lichtempfindlich). Nun wird 10 Minuten bei 60°C im Exsiccator eingetrocknet und anschließend mit 6 n Salzsäure 4 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wird abermals eingetrocknet und die dansylierte AS mit wassergesättigtem Äthylacetat extrahiert. Nach abermaliger Trocknung wird in 20 μ l 50 %igem Pyridin gelöst.

Die Identifizierung der dansylierten Aminosäuren erfolgt durch zweidimensionale Chromatographie auf beidseitig beschichteten Polyamid-Dünnschicht-Platten (Schleicher und Schüll).

Es wurden 3 Systeme verwendet:

System I : 0,5 %ige Ameisensäure

System II : Benzol: Eisessig (1 : 9)

System III: 200 ml Essigsäureäthylester

10 ml Methanol

10 ml Eisessig.

Die Platten hatten 3,75 cm Seitenlänge.

Mit System I wurde in der ersten Richtung chromatographiert, mit System II senkrecht zu I. Einige Aminosäuren überlagern sich bei Chromatographie in System II, so daß anschließend in gleicher Richtung mit System III chromatographiert werden mußte. Bevor die Chromatographiebäder gewechselt wurden, mußte die Platte getrocknet werden, da sonst die Trennschärfe leidet.

Auf einer Seite des Chromatogramms wird die zu identifizierende Probe aufgetragen, auf der anderen Seite ein Referenzgemisch. So wird Identität der Chromatographie-Bedingungen für Probe und Referenz garantiert. Der Nachweis wird siche-

rer. Die Betrachtung der chromatographierten Platten erfolgt im UV-Licht.

An der restlichen Peptidlösung wurde der Abbau durchgeführt:

Zu ca. 20 n Mol Peptidlösung wird Phenylsenföl (ca. 100 μ l 5 %ig in Pyridin) gegeben. Nach 20 minütiger Anlagerungsreaktion bei 60°C überschüssiges Senföl und Pyridin im Heizexsiccator entfernt. (60°C, 1 mm Hg-Bruck, 10 Min.) Anschließend wird mit 100 μ l Trifluoressigsäure cyclisiert und gleichzeitig bei 60°C (5 Min.) die gebildete PTH-Aminosäure abgespalten. Die flüchtige Trifluoressigsäure wird im Exsiccator entfernt. Das Reaktionsgemisch wird im 200 μ l Wasser aufgenommen und mit Essigsäurebutylester die abgespaltene Aminosäure daraus extrahiert. Zur Entfernung noch anhaftenden Esters wird erneut getrocknet. Danach wird das verkürzte Peptid gelöst. Sämtliche Reaktionen können aufs Neue durchgeführt werden. Diese Methode brachte bis zu 9 Schritten gute Ergebnisse.

Bestimmung von C-terminalen Aminosäuren

Hydrazinolyse ¹⁴

Ca. 30 n Mol des Präparats wurden mit 0,5 ml wasserfreiem Hydrazin versetzt, im Glas eingeschmolzen und 10 Stunden auf 100°C erhitzt. Danach wurde die Probe mit Wasser verdünnt, einrotiert und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Der Rückstand wurde mit 1 ml Wasser aufgenommen und die Hydrazide mit 0,5 ml Benzaldehyd in die Schiff'schen Basen überführt. Diese wurden mit Äther ausgeschüttelt. Anschließend wurde die C-terminale Aminosäure durch automatische Aminosäureanalyse nachgewiesen.

Bestimmung mit Carboxypeptidase ³²

Carboxypeptidase existiert in drei unterschiedlichen Formen (A, B, C), die sich lediglich im N-terminalen Ende unter-

scheiden.³³ Alle Formen spalten schrittweise einzelne Aminosäuren vom C-terminalen Ende der Proteinketten ab. Carboxypeptidase A spaltet nicht bei Lys und Arg, B spaltet bevorzugt basische Aminosäuren, während C in der Lage ist über alle Aminosäuren hinwegzuspalten. Ein Nachteil der Carboxypeptidasespaltung besteht darin, daß nicht alle Aminosäuren mit gleicher Geschwindigkeit abgespalten werden. Außerdem kann, bei längeren Reaktionszeiten, auch eine Spaltung innerhalb der Kette auftreten.

2,5 mg des Präparates wurden in 2 ml 0,1 m Natriumboratpuffer von pH 8,5 gelöst und mit 1 % Carboxypeptidase B in Lithiumchloridlösung versetzt. Dann wurde 5,5 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zusatz von Essigsäure die Reaktion unterbrochen. Die Bestimmung erfolgte durch automatische Aminosäureanalyse.

Zusammenfassung

Das Hämoglobin von *Chironomus thummi thummi* wurde aus der Hämolymphe präpariert und daraus einzelne Komponenten isoliert. Hierbei wurde erstmals Komponente XI erhalten und charakterisiert.

Komponente X wurde mit Trypsin gespalten. Aus dem tryptischen Hydrolysat konnten die einzelnen Peptide isoliert werden. Bei einem Teil der Peptide wurde die Aminosäurefolge ermittelt. Auf Grund von Homologien zu CTT-I und CTT-III konnten die tryptischen Peptide zugeordnet werden.

Mehr als die Hälfte der Sequenz von CTT-X wird vorgelegt und mit den entsprechenden Bereichen aus CTT-I und CTT-III verglichen. Es zeigt sich, daß in diesem Bereich in allen Fällen über 50 % der Aminosäuren ausgetauscht sind. Der Hämkomplex dürfte bei CTT-X anders als bei allen bisher untersuchten Chironomushämoglobinen gebildet werden, da hier entscheidende Positionen (CD 3, E 7, G 5) von anderen Aminosäureresten eingenommen werden, als bei CTT-I und CTT-III.

Die Untersuchung der Peptide ergab, daß CTT-X ein gemischtes Hämoglobin darstellt, obwohl es sich in der Disc-electrophorese, Säulenchromatographie und bei Endgruppenbestimmungen als einheitlich erwiesen hatte. Es besteht aus mehreren sehr ähnlichen Komponenten, die sich durch Austausch neutraler Aminosäuren unterscheiden.

Literaturverzeichnis

1. R.J.P. Williams "The Enzymes" 1, 391 (1959) Acad. Pres. N.Y.
2. M.O. Dayhoff und R.V. Eck Atlas of Protein Sequenze und Structure N.B.R.F. Maryland (1968)
3. C.B. Anfinsen Harvey Lectures, Ser. 61, 95 (1967)
4. W.L. Bragg, E.R. Howells und Perutz M.F. Proc. Roy. Soc. A 222, 336 (1954)
5. R. Huber, H. Epp und H. Formanek Naturwis. 55, 75 (68)
Naturwis. 56, 362 (69) J. Mol. Biol. 42, 591 (69)
R. Huber, H. Formanek, V. Braun, G. Braunitzer und W. Hoppe Berichte der Bunsenges. 68, 818 (64)
6. C.R. Shaw Int. Ref. Cytol. 25, 297 (69)
7. C.L. Markert und G.S. Witt Experientia 24, 977 (68)
8. V. Braun Dissertation Universität München (1964)
9. K. Mitzkus Diplomschrift TU München (1970)
P. Stoeckel Diplomschrift TU München (1971)
P. Stoeckel und A. Mayer wird publiziert in Europ. J. Biochem.
O. Kratky et. al. Anz. d. Akad. d. W. Wien 1946
10. S.N. Vinogradow C.A. Machlik, L.L. Chao J.B.C. 24, 6533 (1970)
11. V. Braun, R.R. Crichton und G. Braunitzer Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 197 (1968)
12. H. Neuwirth Dissertation Univ. München (1971)
13. H. Plagens Dissertation in Vorbereitung
14. G. Frank Dissertation Univ. München (1968)
15. G.H. Beaven E.R. Holiday, Advan. Prot. Chem. 7, 319 (52)
16. H. Matsubara, R.M. Sasaki Biochem. Biophys. Res. 35, 175 (1969)
17. B. Liebold, G. Braunitzer Z. Physiol. Chem. 314, 271 (1959)
18. V.M. Ingram Biochim. Biophys. Acta 28, 539 (1958)

19. R.J. Block, E.L. Durrum und G. Zweig, Paperchromatography and Paperelektrophoresis A.P., NY p 128 (1958)
S. Yamad, H.A. Itano Biochim. Biophys. Acta 130, 538 (1966)
20. R.T. Jones Methods of Biochem. Analysis vol. 18, 205
21. V. Rudloff, G. Braunitzer Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 323, 129 (1961)
22. D.H. Spackman, W.H. Stein, S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
23. H. Zuber, Chimia 14, 405 (1960)
24. E. Gross und B. Wittkopp J. Biol. Chem. 237, 1856 (1962)
W.A. Schröder, J.B. Shelton und J.R. Shelton Arch. Biochem. Biophys. 130, 551 (1969)
25. W.R. Gray, B.S. Hartley, Biochem. J. 89, 379 (1963)
W.R. Gray, Methods in Enzymology Vol. 11 p 469 (1967)
K.R. Wood, K. Wang, Biochim. Biophys. Acta 133, 369 (1967)
W. Baumgartner Diplomarbeit Univ. München (1969)
26. = 12.
27. S. Braig Dissertation Univ. München (1970)
28. H.E. Schultze, N. Heimbürger, G. Frank, Biochem. Z. 336, 388 (1962)
29. H. Plagens Dissertation in Vorbereitung
30. M.F. Perutz, J. Mol. Biol. 13, 646 (1965)
M.F. Perutz, H. Muirhead, J.M. Cox und L.C.G. Goaman Nature 219, 131 (1968)
31. V. Kostka, F. Carpenter, J. Biol. Chem. 239, 1799 (1964)
32. R.P. Ambler Methods in Enzymology XI p 155 (1967)
33. M. Nomoto, N.G. Srinivason, A.R. Bradshaw, R.D. Wade and H. Neurath Biochemistry 8, 2755 (1969)

Lebenslauf

Am 23.9.1942 wurde ich in Nesselsdorf (CSSR) als sechstes Kind von August Silz und seiner Ehefrau Maria geboren.

In München besuchte ich von 1948 bis 1956 verschiedene Volksschulen. Bis 1959 schloß sich der Besuch der Städtischen Mittelschule bis zur mittleren Reife an.

Das Pflichtpraktikum für ein geplantes Ingenieurstudium wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München bis 1960 abgeleistet. Nach Abschluß dieses Praktikums entschloß ich mich zu weiterem Schulbesuch. 1963 legte ich an der Rupprecht Oberrealschule in München das Abitur ab.

Im Wintersemester desselben Jahres begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München, wo ich im Sommer 1966 das Diplomchemiker-Vorexamen ablegte. Das Diplomzeugnis wurde mir im August 1970 ausgehändigt.

Im September 1970 heiratete ich Ilse Lang aus Fürth an der Saar.

Seit September 1968 bin ich im Max-Planck-Institut für Biochemie in der Abteilung von Prof. Dr. G. Braunitzer tätig. Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit vom Januar 1970 bis April 1971 durchgeführt.

